

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK, FRAKSI, DAN
SUB-FRAKSI DAUN JATI (*Tectona grandis* Linn. f.)
DENGAN METODA *BRINE SHRIMP*
*LETHALITY BIOASSAY***

SKRIPSI SARJANA FARMASI

Oleh

MARDHA AKHSANITA
No. BP : 07931013



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2012

I. PENDAHULUAN

Tumbuhan merupakan sumber daya alam yang besar manfaatnya bagi manusia, baik sebagai bahan pangan, sandang maupun sebagai bahan obat-obatan. Penelitian dan pengembangan obat dari bahan alam terutama tumbuh-tumbuhan merupakan tantangan untuk dijadikan peluang bagi akademisi dan industri farmasi nasional (Arbain, 2002). Tumbuhan juga merupakan gudang kimia terkaya, karena beribu-ribu komponen kimia yang bermanfaat secara kefarmasian terkandung di dalamnya (Rivai, 2002). Disisi lain, fungsi dan peran setiap komponen kimia tumbuhan belum terungkap seluruhnya. Sementara bukti khasiat dari komponen kimia tersebut banyak terlihat seperti pemanfaatannya secara empiris sebagai obat tradisional (Kardinan dan Taryono, 2003).

Tanaman *Tectona grandis* Linn. f. adalah salah satu jenis pohon yang kayunya terkenal di dunia, yang disebut Teak. Keunggulannya antara lain stabilitas dimensi, daya tahan dan soliditas tekstur yang juga tidak gampang membusuk. Secara tradisional daun jati telah digunakan oleh masyarakat di daerah Solok sebagai pewarna makanan, dengan cara memasukkan daun jati untuk bersama-sama direbus dengan pisang, sehingga rebusan pisang yang biasanya berwarna kuning menjadi berwarna merah kecoklatan. Untuk membuat gudeg di Yogyakarta, nangka muda dimasak dengan santan, warna coklat pada nangka dihasilkan oleh daun jati yang dimasak bersamaan dengan santan. Daun jati juga digunakan untuk pembungkus berbagai makanan seperti pembungkus nasi oleh masyarakat Jamblang, pembungkus tempe oleh masyarakat Yogyakarta, Jawa Timur, dan Jawa Tengah, dan pembungkus daging oleh masyarakat Sukabumi. Di Jawa Timur masyarakat Pulau Bawean menyeduh daun jati untuk menghasilkan bahan

pewarna coklat merah alami. Orang Lamongan memilih menyeduh tumbukan daun mudanya. Orang Madura mencampurkan tumbukan daun jati dengan asam jawa. Sekelompok mahasiswa IPB (Institut Pertanian Bogor) dalam Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) menggunakan sari daun jati sebagai pewarna alami gulali (permen) ekstrak belimbing wuluh sebagai jajanan sehat untuk anak. Berdasarkan *Philippine Medicinal Plants* rebusan daun jati digunakan mengobati hemoptisis (batuk darah), gangguan menstruasi, pendarahan, dan mengobati sakit tenggorokan dengan cara dikumur air rebusannya.

Beberapa penelitian aktifitas farmakologi terhadap jati, telah melaporkan bahwa jati mempunyai efek farmakologi sebagai antitukak, antianemia, antibakteri dan menyembuhkan luka (Goswami, *et al.*, 2009). Penelitian lain juga melaporkan bahwa jati mempunyai aktifitas yaitu mengobati pilek, sakit kepala, laksatif, sedatif, bronkitis, diuretik, anti diabetes, kudis, analgetik, dan anti inflamasi (Singh, Bhuyan, and Ahmed, 1996; Nayeem and Karverkar, 2010; Ghaisas *et. al.*, 2009; Diallo, Gbeassor, Vovor, Eklu, and Aklikokou, 2008).

Selain itu juga telah dilakukan uji aktifitas sitotoksik dari ekstrak petrol akar kayu jati *Tectona grandis* yang menunjukkan aktifitas sitotoksitas yang tinggi dengan menggunakan Metoda *Brine Shrimp Lethality Bioassay* dengan Lc50 5 ppm (Sandermann dan Simatupang, 1966). Pemeriksaan fitokimia ekstrak etanol daun jati (*Tectona grandis* L. f.) Verbenaceae menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, saponin, tanin galat, tanin katekat, kuinon, dan steroid/triterpenoid (Hartati, Gana, Ruslan, 2005).

Mengingat pemanfaatan daun jati yang beragam dimasyarakat yang masih berdasarkan pengalaman yang turun temurun, maka sangat diperlukan informasi ilmiah mengenai keamanannya. Untuk keamanan pemanfaatan daun jati, maka perlu dilakukan pengujian sitotoksik. Disini uji ekstrak, fraksi dan subfraksi daun jati telah dilakukan secara *in vitro* terhadap larva *Artemia salina* Leach. dengan metode *Brine Shrimp Lethality Bioassay*.

Metode yang digunakan dalam mengisolasi tumbuhan ini adalah ekstraksi secara maserasi. Maserasi merupakan proses penyarian sederhana dengan jalan merendam bahan alam atau tumbuhan dalam pelarut yang sesuai selama 3-5 hari. Keunggulan dari proses maserasi ini yaitu teknik pengerjaan yang sederhana dan dapat digunakan untuk semua jenis sampel, baik basah ataupun kering dan juga bersifat termolabil (Kazuaki, Subeki, Nabeta, and Yamazaki, 2009).

Kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi yang merupakan tahapan kedua dari proses pemisahan senyawa. Fraksinasi adalah tehnik pemisahan dan pengelompokan kandungan kimia ekstrak berdasarkan kepolaran. Pada proses fraksinasi digunakan dua pelarut yang tidak tercampur dan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak akan terpisah menurut kepolarannya (Hawkins, and Rahn, 1997). Kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui kelompok senyawa yang terdapat pada hasil fraksinasi, pemisahan noda dan eluen yang cocok (Harbone, 1987).

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani *Tectona grandis* Linn. f.

2.1.1 Klasifikasi

Tumbuhan *Tectona grandis* Linn. f. diklasifikasikan sebagai berikut
(Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010; Sastromihardjojo, 1985):

Kerajaan : Plantae

Super Divisio : Spermatophyta

Divisio : Magnoliophyta

Kelas : magnoliopsida

Subkelas : Asteridae

Ordo : Lamiales

Famili : Verbenaceae

Genus : Tectona

Spesies : *Tectona grandis* Linn. f.

Nama lokal/daerah : Jati (Indonesia); Sagun (India) Lyiu (Burma) Mai Sak (Thailand)
Teak (Inggris); Teck (Perancis); Teca (Spanyol); Java Teak
(Jerman).

2.1.2 Morfologi *Tectona grandis* Linn. F

Tumbuhan *Tectona grandis* Linn. f. berupa pohon yang menggugurkan daun. Pada kondisi baik, tingginya dapat mencapai 30-40 m. Diameter batang dapat mencapai 220 cm. Pada habitat kering, pertumbuhan menjadi terhambat, cabang lebih banyak, melebar dan membentuk semak. Pada tapak bagus, batang bebas cabang 15-20 m atau lebih, percabangan kurang dan rimbun. Pohon tua sering beralur dan berbanir. Kulit batang tebal, abu-abu atau coklat muda ke abu-abuan yang mudah terkelupas. Daun lebar, panjang 25-50 cm, lebar 15-35 cm, letak daun bersilangan, bentuk daun elips melebar, jorong atau bulat telur terbalik. Ujung daun runcing, meruncing dan tumpul. Pangkal daun runcing, meruncing dan tumpul. Tepi daun rata, bergelombang, dan bertoreh. Bagian bawah abu-abu, tertutup bulu berkelenjar warna merah. Daun muda berwarna hijau kecoklatan, sedangkan daun tua berwarna hijau tua keabua-abuan. Ukuran bunga kecil, diameter 6-8 mm, keputih-putihan. Kelopak bunga berjumlah 5-7

dan berukuran 3-5 mm. Mahkota bunga tersusun melingkar. Berkelamin ganda terdiri benang sari dan putik yang terangkai dalam tandan besar. Tangkai putik berjumlah 5-6 buah dengan filamen berukuran 3 mm, antena memanjang berukuran 1-5 mm, ovarium bulat berukuran sekitar 2 mm. Jumlah kuncup bunga 800-3.800 per tandan, bunga mekar dalam waktu 2-4 minggu. Bunga yang terbuahi akan menghasilkan buah berukuran 1-1,5 cm. Buah berkeping 2 dengan kotiledon yang panjangnya 3-6 mm (Heyne; Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010; Rachmawati, Iriantono, dan Hansen, 2002; Departemen Pertanian Republik Indonesia, 2006; Backer and Bakhuizen, 1965).

2.1.3 Penyebaran dan habitat

2.1.3.1 Sejarah Budidaya

Distribusi alami jati di Asia Tenggara, dari benua India melalui Myanmar dan Thailand ke Laos. Batas utara pada garis 25° LU di Myanmar, batas selatan pada garis 9° LU di India. Jati tersebar pada garis 70°-100° BT. Budidaya awal adalah oleh masyarakat Hindu, mungkin dalam abad ke-7, tidak jelas. hal ini percaya jati diperkenalkan ke Jawa 400-600 tahun dari India. Pada awal abad ini, *T. grandis* diperkenalkan ke Timur dan Afrika Barat dan 'Trinidad jati' telah menjadi sangat terkenal di wilayah Karibia. Hal ini ditanam untuk kayu atau ornamen dan dalam kebun botani. *T. grandis* sejauh ini adalah kayu ekspor terpenting di Thailand sampai semua penebangan di hutan alam dilarang pada tahun 1989. Penyebarannya ternyata terputus-putus. Hutan jati terpisah oleh pegunungan, tanah-tanah datar, tanah-tanah pertanian dan tipe hutan lainnya. Di Indonesia, jati bukan tanaman asli, tetapi sudah tumbuh sejak beberapa abad lalu di

Pulau Kangean, Muna, Sumbawa dan Jawa (Heyne; Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010)

2.1.3.2 Habitat Alami

Tectona grandis Linn. f. akan bertahan dan tumbuh di bawah berbagai iklim. Jati tumbuh terbaik di iklim yang hangat dan lembab, iklim tropis dengan perbedaan yang signifikan antara musim kering dan basah (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

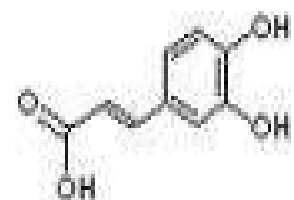
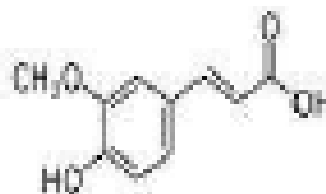
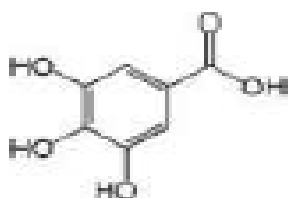
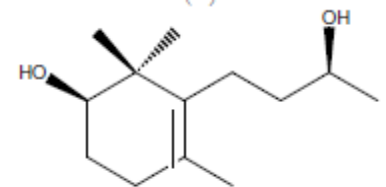
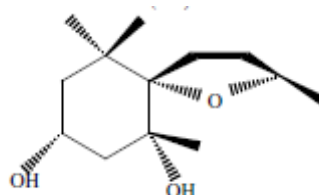
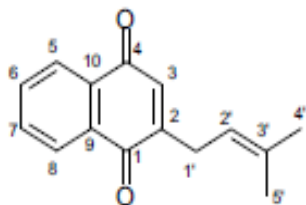
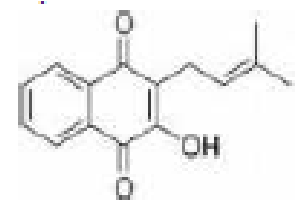
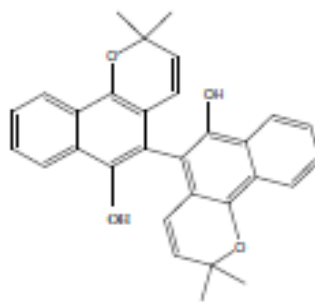
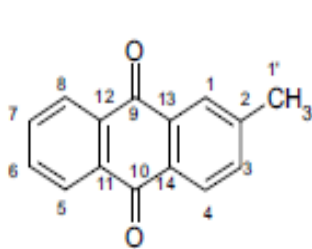
2.1.3.3 Distribusi geografis

Tectona grandis tersebar diberbagai tempat, yaitu India, Semenanjung Barat, Konkani, Burma, Myanmar, Thailand, Laos, eksotis ke Antigua dan Barbuda, Bangladesh, Barbados, Brasil, Brunei, Kamboja, Cina, Pantai Gading, Kuba, Dominika, Republik Dominika, Ghana, Grenada, Guadeloupe, Jamaika, Kenya, Malaysia, Mauritius, Nepal, Nigeria, Pakistan, Panama, Filipina, Puerto Rico, Afrika Selatan, Sri Lanka, St Lucia, St Vincent dan Grenadines, Tanzania, Togo, Trinidad dan Tobago, Uganda, Vietnam, Amerika Serikat, Kepulauan Virgin (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.1.4 Kandungan Kimia dan Bioaktivitas *Tectona grandis* Linn. F

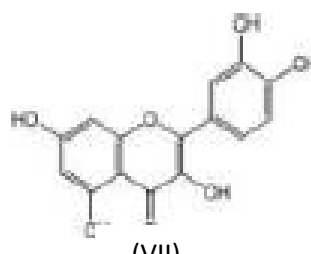
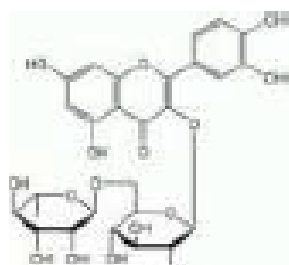
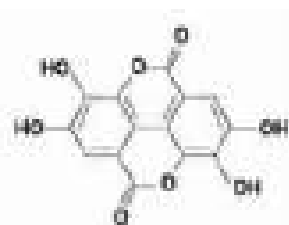
Dari species *Tectona grandis* Linn. f. telah banyak diisolasi senyawa kimia utama dengan berbagai aktivitas, antara lain: betulin, lupeol, asam betulinat, dan betulin aldehid yang aktif sebagai antitumor, telah diisolasi dari kulit batang kayu jati (Pathak, Neogi, Biswas, Tripathi, and Pandey, 1988). Dari bagian akar, telah berhasil diisolasi beberapa senyawa, yaitu tektoquinon (I), tektol (II), β -sitosterol, β -lapakol (Goswami, *et al.*, 2009). Berdasarkan penelurusan pusataka diketahui bahwa kandungan kimia daun

jati yang telah dilaporkan adalah golongan kuinon yaitu tectokuinon, lapachol (III), deoxylapachol (IV) dan isomernya, tectoleafokuinon, antrakuinon, dan pigmen naphthakuinon. Senyawa steroid yaitu squalene, poli-isoprena- α -tolyl metil eter, asam betulinat, tekto grandone, monoterpen, apokarotenoids: Tectoionols-A (V), asam Tectoionols-B (VI). Glikosida yaitu glikosida antrakuinon. Asam fenolat yaitu asam tanin, asam galat (VII), asam ferulic (VIII), asam caffeic (IX) dan ellagic acid (X). Flavonoid yaitu rutin (XI) dan kuersitin (XII). Daun *Tectona grandis*, Linn. f. juga dilaporkan mengandung karbohidrat, alkaloid, tanin, sterol, saponin, protein, kalsium, fosfor, serat kasar dan juga mengandung zat warna kuning-



cokelat atau kemerahan (Aradhana, *et al.*, 2010).

(I)



(IV)

(VII)

(VIII)

Gambar 1: Struktur Senyawa Hasil Isolasi pada Tanaman *Tectona grandis* Linn. f.

(Pathak, Neogi, Biswas, Tripathi, and Pandey, 1988; Goswami, *et al.*, 2009; Aradhana, *et al.*, 2010)

(X)

(XII)

(XII)

2.1.5 Penggunaan Tradisional

2.1.5.1 Akar

Kulit dari akar *Tectona grandis* di Sulawesi Selatan digunakan untuk mewarnai anyaman, sebelum meningkat pada pengecatan yang sebenarnya pias-pias itu dicelup dalam seduhan dari kulit jati, sehingga ia mendapatkan warna kuning; pada perendaman yang berulang-ulang pias-pias itu menjadi lebih kelam dan akhirnya kuning coklat. Bahan yang telah mengalami pengolahan pendahuluan ini mengandung zat warna yang asli/sebenarnya, sehingga ia tidak dapat dicuci habis/luntur dengan air (Heyne). Kulit jati juga dapat digunakan untuk mengobati anuria dan retensi urin (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.1.5.2 Kayu

Kayu jati mempunyai suatu kombinasi yang sangat bagus dari sifat-sifat baik kayu yang tidak mudah ditemukan pada jenis lainnya. Ia adalah, terutama dengan

memperhatikan berat jenisnya, sangat awet/tahan lama; ia cukup kuat untuk digunakan semua tujuan konstruksi-konstruksi yang normal, ia mempunyai rupa yang cukup baik menyusut dan memfaal sedikit, bahkan dalam keadaan yang tidak menguntungkan, sedangkan sehubungan dengan itu kerugiannya kayu karena retakan-retakan selama ditimbunnya adalah sedikit. Ia dengan cukup mudah dapat dikerjakan dan dipakunya dan dapat menahan paku dengan baik. Besi yang telah berkarat dapat merusak kayu, namun jati ternyata bersifat tahan karat. Ia sangat berguna bagi hampir semua tujuan konstruksi, seperti tiang, balok, dan gelegar pada bangunan jembatan dan bangunan rumah, atap, kosen, pintu, dan jendela, untuk perancah dan papan bendungan dalam air tawar, untuk bantalan dan dinding kayu dari gerbong kereta api, untuk perkakas rumah tangga dan dinding rumah, untuk tujuan-tujuan ilmu dan tujuan mewah dengan syarat sedikit terdapatnya perubahan bentuk, untuk papan dinding dan papan geladak dari kapal laut, untuk lapisan bawah dari pelat panser pada kapal-kapal perang, untuk pelapisan jalan dan untuk pemasangan lantai, baik dalam bentuk papan maupun sebagai lantai parket, untuk bantalan rel dan sirap, dsb. Selain penggunaannya secara teknis ia juga dapat digunakan untuk pengobatan, yaitu untuk menahan kolera yang mengganas, dimana Orang Melayu menggunakan kayu jati dan *kayu tahi* (*Celtis*), kemudian diremas-remas dalam air, dan diminum airnya (Heyne). Juga digunakan untuk sedatif, antelmintik, pengobatan pada gravid uterus, leukoderma, disentri, sakit kepala, nyeri pada hati, antiinflamasi, mata, depuratif, laksatif, neuralgia, arthritis, dispepsia, perut kembung, batuk, penyakit kulit, kista, menoragia. Pasta dari kayu jati digunakan untuk diuretik, stimulan, anstringen, dan sakit gigi (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.1.5.3 Daun

Daun jati banyak digunakan secara tradisional diantaranya seduhan dari daunnya, diminum seperti teh, digunakan untuk mengobati kolera. Dimana saja jati tumbuh daun mudanya digunakan untuk mewarnai bahan anyaman, warna coklat merah dari karya anyaman pandan dari Bawean diperoleh dengan merebusnya dengan seduhan dari daun itu selama setengah hari. Di Lamongan daun-daun muda itu ditumbuk sampai menjadi bubur dengan ditambahkan air, kemudian disaring dengan lap kasa dan hasil cairan itu dalam keadaan mendidih digunakan sebagai celupan pewarna. Di Madura ditambah asam, ditempat lain sedikit kapur (Heyne). Juga digunakan untuk atap. Untuk pengobatan yaitu sebagai hemostatik, depurative, anti inflamasi, vulnery, lepra, penyakit kulit, puritus, stomatitis, borok, pendarahan, Hemoptisis (batuk darah) (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010). Berdasarkan *Philippine Medicinal Plants* rebusan daun jati digunakan mengobati hemoptisis (batuk darah), gangguan menstruasi, pendarahan, dan mengobati sakit tenggorokan dengan cara dikumur air rebusannya.

2.1.5.4 Biji

Biji jati digunakan secara tradisional untuk diuretik, emollient, menghilangkan rasa sakit, penyakit kulit, pruritis. Minyak bijinya digunakan untuk menyuburkan rambut, eksim, kurap, dan kudis (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.1.5.5 Kulit kayu

Kulit kayu jati digunakan secara tradisional untuk bronkitis, konstipasi, antelmintik, depuratif, disentri, luka bakar, diabetes, penyakit kulit, leukoderma, sakit

kepala, bengkak, laksatif, ekspektoran, antiinflamasi, gangguan pencernaan, antelmintik (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.1.5.6 Bunga

Bunga digunakan secara tradisional untuk bronkitis, gangguan saluran kencing, diuretik, depuratif, anti inflamasi, luka bakar, dipsia, penyakit kulit. Minyak bunganya digunakan untuk menyuburkan rambut, eksim, dan kurap (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.1.5.7 Buah

Buah digunakan secara tradisional untuk diuretik, menghilangkan rasa sakit, pruritus, dan sakit perut (Aradhana, Rao, Banji and Chaithanya, 2010).

2.2 Kuinon

2.2.1 Tinjauan Umum

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon (Harborne, 1983)

Kuinon adalah segolongan senyawa karbonil. Strukturnya siklik dan merupakan diketon yang berkonjugasi. Contoh yang paling sederhana adalah 1,4-benzokuinon. Semua kuinon berwarna. Kebanyakan kuinon terdapat pada pigmen tanaman, dan sering mempunyai aktivitas biologis yang khusus (Hart, 1983). Warna pigmen kuinon alam beragam, mulai dari kuning pucat sampai ke hampir hitam, dan struktur yang telah dikenal jumlahnya lebih dari 450 (Thomson, 1971).

Untuk tujuan identifikasi, kuinon dapat dipilah menjadi empat kelompok:

- benzokuinon
- naftokuinon
- antrakuinon
- kuinon isoprenoid

Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat “senyawa fenol” serta mungkin terdapat in vivo dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau dalam bentuk kuinol tanwarna, kadang – kadang juga bentuk dimer. Dalam hal demikian, diperlukan hidrolisis asam untuk melepaskan kuinon bebasnya.

Kuinon isoprenoid terlibat dalam respirasi sel (ubikuinon) dan fotosintesis (plastokuinon) dan dengan demikian tersebar semesta dalam alam (Bruneton, 1999).

2.2.2 Penyebaran (Bruneton, 1999)

Lebih dari 1200 kuinon telah ditemukan terutama pada kerajaan tumbuhan yaitu pada: Angiospermae, Gymnospermae, Fungi, Lichens, dan jarang pada Fili. Juga terdapat pada kerajaan hewan terutama pada Echinodermata dan Arthropoda.

Benzokuinon sederhana adalah karakteristik dari Arthropoda dan agak jarang pada tumbuhan tingkat tinggi, dimana mereka tampaknya spesifik untuk sejumlah famili: Myrsinaceae, Primulaceae, dan Boraginaceae. Sangat luas 2,6-dimethoxy-1,4-benzokuinon kemungkinan adalah hasil degradasi dari lignin.

Penyebaran naphtakuinon terbatas pada fungi dan sporadis pada Angiospermae yang secara umum terdapat dengan jumlah yang sedikit pada famili: Biogniaceae, Ebenaceae, Droseraceae, Juglandaceae, Plumbaginaceae, Boraginaceae, Lytharaceae, Proteaceae, Verbenaceae, dan lainnya.

Antrakuinon agak luas terdistribusi: Fungi, Lichens dan tingkat yang lebih rendah pada Spermatophyta. Antrakuinon melimpah pada kelompok kecil famili: Rubiaceae, Fabaceae, Polygonaceae, Rhamnaceae, Liliaceae, Scrophulariaceae dan lainnya, dimana sering terdapat dalam bentuk glikosida.

2.2.3 Biosintesa (Bruneton, 1999)

Biosintesa kuinon dikarakterisasi dengan keberagaman jalur metanol yang memungkinkan berbagai organisme hidup menguraikan dari sejumlah prekursor terbatas: asetat dan melonat, mevalonat, dan fenilalanin.

2.2.3.1 Jalur Poliketida

Sejumlah besar kasus, struktur kuinon mengungkapkan bagaimana muncul dari siklisasi suatu poli- β -ketoester: menghasilkan chrysophanol, dan lebih umum 1,8-dihidroksiantrakuinon; juga menghasilkan aloesaponarin dan senyawa antara. Beberapa naphtakuinon (misalnya dari Plumbaginaceae) mempunyai seperti suatu permulaan.

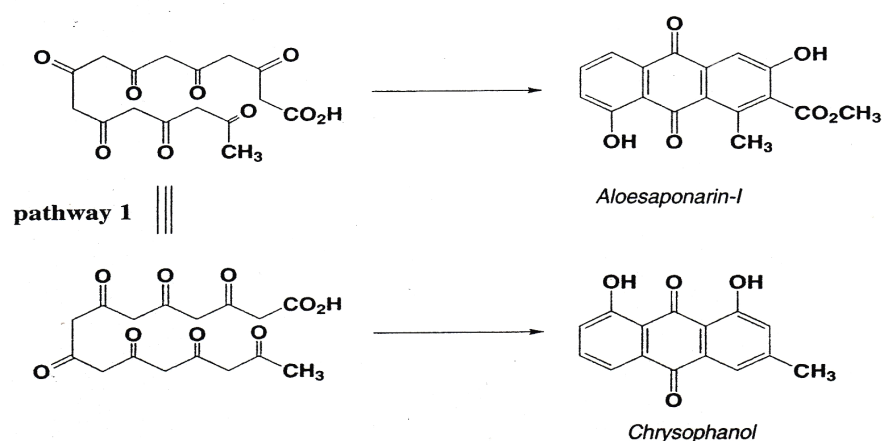
2.2.3.2 Jalur Mevalonat dan Asam Chorismic

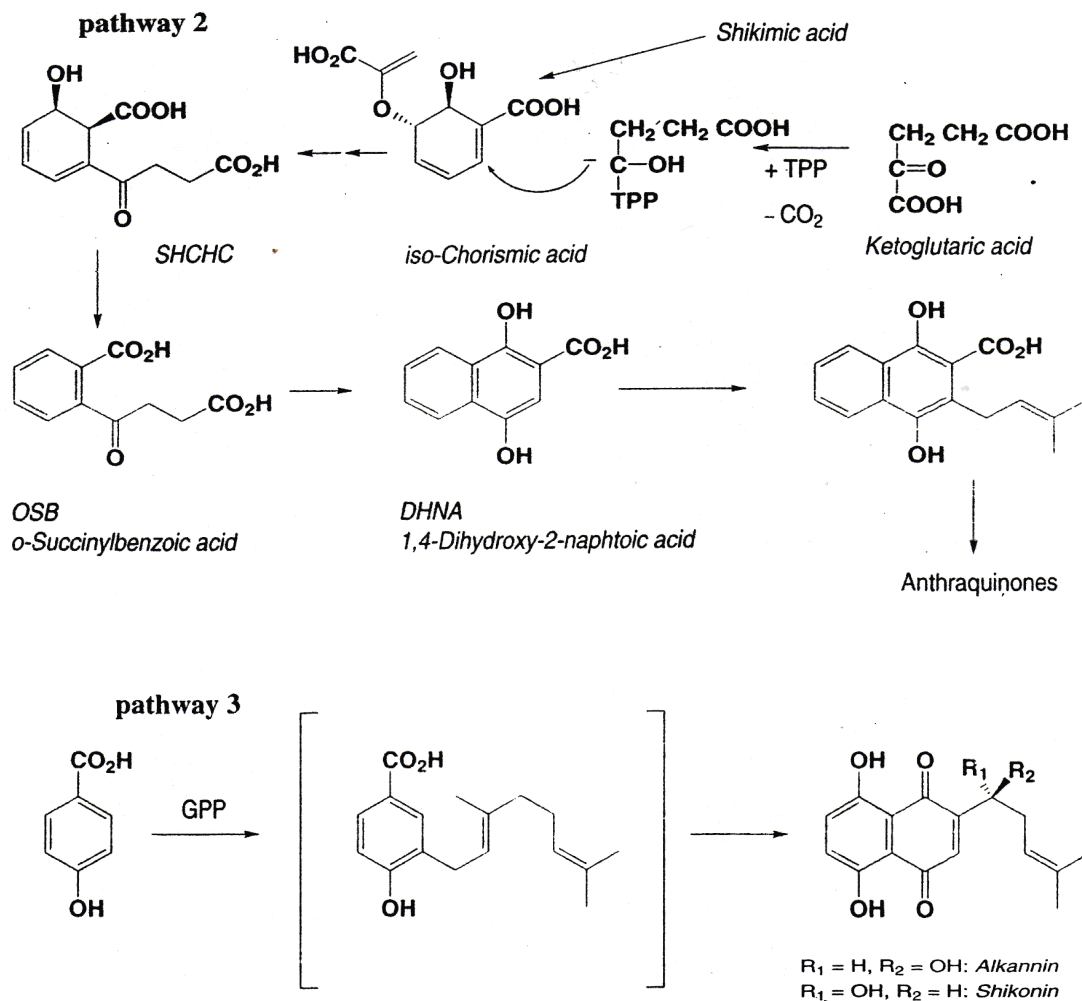
Jalur lain dengan bukti yang paling umum terjadi pada tumbuhan tingkat tinggi adalah dari asam-o-succinilbenzoic (=OSB= 4-(2'-karboksifenil)-4-asam oksobutanoic).

Asam ini terbentuk dari reaksi asam isochorismic dengan asam α -ketoglutaic dibantu dengan tiamin pirofosfat. Ini kemudian terasilisasi oleh koenzim A dan terbentuk siklik menjadi 1,4-dihidroksi-2-naphthoic acid (=DHNA), prekursor langsung dari naphtakuinon. Dalam beberapa kasus, khususnya Rubiaceae, jalur ini dapat menuntun menuju antrakuinon: isoprenilasi pada posisi 3 pada DHNA oleh dimetilalil pirofosfat (=DMAPP). Siklisasi, dan aromatisasi. Pada famili lainnya, DMAPP lebih mudah teralkilasi pada C-2.

2.2.3.3 Jalur Asam-4-Hidroksibenzoic

Jalur asam 4-hidroksibenzoic menuntun -pada Boraginaceae- menjadi naphtakuinon seperti sikonin dan isomernya, alkannin. Asam 4-hidroksibenzoic yang terbentuk dari metabolisme fenilalanin, bertindak sebagai akseptor untuk proses alkilasi oleh satu molekul geranil pirofosfat (=GPP).





Gambar 2: Biosintesa Kuinon (Bruneton, 1999)

2.2.4. Deteksi, Pemisahan, dan Identifikasi (Bruneton, 1999)

Tidak seperti pada pigmen flavonoid atau karotenoid, hidroksikuinon (yang berbeda dengan kuinon isoprenoid) menyebar dalam tumbuhan secara sporadis. Karena itu, diperlukan cara pemisahan pendahuluan dari pigmen tumbuhan jenis lain. Hidroksikuinon mungkin terlihat pada pemeriksaan kromatografi kertas berupa pigmen kuning atau jingga yang bergerak ke garis depan dalam pengembang yang mengandung butanol (BAA), dan biasanya tidak naik dalam pengembang yang mengandung air.

Mereka menunjukkan warna pudar pada penyinaran dengan UV dan mungkin tidak bereaksi bila diuapi amonia. Senyawa kuinon yang terdapat sebagai glikosida mungkin larut sedikit dalam air, tetapi umumnya kuinon lebih mudah larut dalam lemak dan akan terekstraksi dari ekstrak tumbuhan kasar bersama-sama dengan karotenoid dan klorofil. Mereka dapat dipisahkan dengan KLT pada pelat silika gel dan biasanya dapat dipisahkan dengan baik dengan kromatografi.

Untuk memastikan apakah suatu pigmen termasuk kuinon atau bukan, reaksi warna sederhana masih berguna. Reaksi yang khas ialah reduksi bolak-balik yang mengubah kuinon menjadi senyawa tanwarna, kemudian warna kembali lagi bila terjadi reaksi oksidasi oleh udara. Reduksi dapat dilakukan dengan menggunakan natrium borohidrida dan oksidasi langsung dapat terjadi hanya dengan mengocok larutan tersebut di udara. Cara ini dapat dilakukan dengan kromatogram; bila disemprot dengan biru leukometilena, kuinon menghasilkan bercak biru pada latar belakang putih. Untuk kebanyakan kuinon, hasil uji reduksi dalam larutan yang agak basa lebih mencolok dan oksidasi ulang di udara terjadi lebih cepat. Kuinon menunjukkan geser batokrom yang kuat dalam basa, tetapi ini bukan ciri khasnya karena pigmen fenol lain pun menunjukkan hal yang sama. Warna yang terlihat beragam, mulai dari jingga dan merah sampai ke ungu dan biru; bahkan pada beberapa kasus terbentuk warna hijau (1,2,3-trihidroksiantrakuinon).

KLT merupakan cara yang umum untuk memisahkan kuinon. Tetapi. Begitu banyak keragaman struktur sehingga tak satu pun sistem atau deretan sistem yang berkaitan dapat digunakan secara umum pada kuinon. Benzokuinon sederhana dan naftokuinon sederhana sangat mudah larut dalam lemak dan mereka mungkin dapat

dipisahkan memakai pengembang benzena murni, kloroform murni, eter minyak bumi murni atau campuran sederhana pelarut tersebut. Sebaliknya, antrakuinon yang banyak hidroksilnya sangat polar dan diperlukan campuran pelarut rumit agar mereka bergerak. Karena kuinon berwarna, mendeteksinya pada plat KLT dengan sinar tampak tidak sukar, tetapi pemeriksaan sinar uv mungkin bermanfaat dan merupakan pendeteksi yang lebih.

KCKT dapat digunakan juga untuk analisis kuinon. Benzokuinon dan naftokuinon telah dipisahkan pada kolom Micropak Si-10 dengan fase gerak isopropanol 1% dalam eter minyak bumi, sementara itu antrakuinon dapat dipisahkan pada kolom Micropak CH-5 dengan fase gerak metanol-air (1:1) yang diasamkan sampai Ph 3.

Mengukur spektrum sangat penting untuk mengidentifikasi kuinon. Spektrum UV dan spektrum tampak menunjukkan anak kelas kuinon karena letak dan jumlah pita serapan meningkat dengan meningkatnya kerumitan struktur. Spektrum inframerah kuinon menunjukkan secara khas pita karbonil yang kuat, dan dari spektrum massanya kuinon dapat dikenal karena kemudahannya melepaskan satu dan dua molekul karbon monoksida dari puncak ion induk.

2.2.5 Sifat Biologis dan Penggunaan Kuinon – Mengandung Obat-Obatan

Benzokuinon alami tidak memiliki efek terapeutik. Tetapi, dalam bentuk tereduksi 1,4-benzokuinon (hidrokuinon) yang terdapat sebagai glikosida, dengan nama arbutin, merupakan molekul yang memiliki efek antiseptik kuat pada saluran kemih. Hidrokuinon sintesis, pada penggunaan lain, memiliki aplikasi dermatologis dan industri (fotografi).

Banyak naftakuinon merupakan antibakteri dan antifungi (kehadiran mereka menjelaskan bahwa beberapa kayu tropis seperti jati resisten terhadap jamur, serangga,

dan secara umum pada organisme xylophagous. Nukleopilisitas molekul ini juga menjelaskan sitotoksitasnya. Aktivitas antiprotozoa dan antivirus telah digambarkan dan beberapa molekul pada kelompok memiliki toksisitas non-trivial. Umumnya, tidak ada naftakuinon alami yang dipasarkan untuk terapi, dan hanya dalam jumlah terbatas obat-obatan yang mengandung naftakuinon tinggal pada penggunaan produksi galenical (misal *Drosera sp.*).

Obat-obatan yang mengandung derivat 1,8-dihidroksiantrakuinon bersifat laksatif. Beberapa kuinon mengandung obat telah dihargai sebagai pewarna. Ini termasuk kepada tumbuhan obat yang mengandung antrakuinon atau naftakuinon. Antrakuinon dan naftakuinon merupakan bahan pewarna alamiah yang lazim. Juglon ialah naftakuinon yang berperan sebagian dalam pewarnaan kulit biji walnut. Lawson memiliki struktur serupa dengan juglon; zat ini terdapat dalam inai (*henna*) India, yang digunakan sebagai cat pemerah rambut. Suatu antrakuinon yang khas, asam karminat, merupakan pigmen merah utama cochineal, suatu jenis seranggan (kepik; *coccus cacti* L), yang digunakan sebagai warna merah dalam makanan dan kosmetik. Alizarin adalah zat warna lain dari kelas antrakuinon (Fessenden, 1997).

2.3 Ekstraksi dan Fraksinasi

2.3.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan lain-lain menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan metoda ekstraksi tergantung pada tekstur, kandungan air dan jenis senyawa yang diisolasi dari suatu tumbuhan / hewan, sehingga senyawa kimia yang diekstraksi dapat

tertarik sempurna tanpa mengalami perubahan sifat dan strukturnya. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Untuk memilih pelarut yang akan dipakai dalam ekstraksi harus diketahui sifat kandungan kimia metabolit sekunder yang akan diisolasi. Senyawa polar lebih mudah larut dalam pelarut polar dan senyawa non polar mudah larut dalam non polar (Harborne, 1987).

Ada beberapa metoda yang dapat digunakan untuk mengekstraksi simplisia, yaitu:

1. Maserasi (Harborne, 1987).

Maserasi merupakan proses penyarian sederhana yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai selama 3-5 hari. Pelarut akan menembus ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa metabolit, senyawa metabolit akan larut dan karena perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa metabolit di dalam sel dengan yang di luar sel maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Keuntungan dari metoda maserasi yaitu, teknik pengerjaan dan alat yang digunakan sederhana serta dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termostabil.

2. Digestasi (Voight, 1994)

Digestasi adalah proses penyarian yang sama seperti maserasi dengan menggunakan pemanasan pada suhu 30°C - 40°C . Cara ini dilakukan untuk simplisia yang pada suhu biasa tidak tersari dengan baik.

3. Infusa (Departemen Kesehatan RI, 2000; Voight, 1994)

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), selama 15 menit dihitung mulai suhu mencapai 90⁰ C.

4. Dekokta (Voight, 1994)

Dekokta adalah proses ekstraksi yang hampir sama dengan infusa, perbedaannya pada dekokta digunakan pemanasan selama 30 menit dihitung mulai suhu mencapai 90⁰ C. Cara ini dapat dilakukan untuk simplisia yang mengandung bahan aktif yang tahan pemanasan.

5. Perkolasi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1974)

Perkolasi adalah ekstraksi dengan jalan melewatkan pelarut melalui wadah yang diisi sampel dengan kecepatan tertentu. Kecuali dinyatakan lain, dinyatakan sebagai berikut: simplisia dengan derajat kehalusan tertentu sebanyak 10 bagian dibasahi dengan cairan penyari sebanyak 2,5 – 5 bagian, biarkan selama 3 jam dalam bejana tertutup. Pindahkan masa sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, sambil tiap kali ditekan, hati-hati, tuangi dengan cairan penyari secukupnya sampai cairan penyari menetes dan diatas simplisia terdapat selapis cairan penyari, tutup perkolator, biarkan 24 jam. Biarkan cairan menetes sampai dengan kecepatan 1 ml permenit. Tambahkan berulang-ulang cairan penyari secukupnya, sehingga selalu ada selapis cairan penyari sampai didapat 80 bagian perkolat dan tambahkan cairan penyari sampai 100 bagian perkolat. Tutup dan biarkan selama 2 hari di tempat yang sejuk dan terlindung dari cahaya.

6. Sokletasi (Padmawinata, 1997; Voight, 1994)

Sokletasi merupakan suatu cara pengekstraksian simplisia dengan memakai alat soklet. Pada cara ini, pelarut dan simplisia ditempatkan secara terpisah. Sokletasi digunakan untuk simplisia dengan senyawa yang relatif stabil dan tahan terhadap pemanasan. Prinsip sokletasi adalah penyarian secara terus menerus sehingga penyarian lebih sempurna dengan memakai pelarut yang relatif sedikit. Jika penyarian telah selesai maka pelarutnya diuapkan dan sisanya adalah zat tersari. Biasanya pelarut yang mudah menguap atau yang mempunyai titik didih rendah.

2.3.2 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan ekstrak hasil maserasi yang telah diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental. Fraksinasi ini menggunakan berbagai pelarut dengan kepolaran yang berbeda-beda, sehingga masing-masing pelarut mengandung senyawa dengan kepolaran yang berbeda pula.

2.4. Metode Pemisahan dan Pemurnian

2.4.1 Kromatografi

Hasil ekstraksi dan fraksinasi biasanya masih berupa campuran beberapa senyawa yang harus dipisahkan menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana dan tunggal. Umumnya untuk pemisahan senyawa dapat dilakukan dengan teknik kromatografi.

Kromatografi adalah suatu teknik analisis yang banyak diterapkan untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran. Semua metoda kromatografi

didasarkan atas komponen diantara dua fasa yang tidak bercampur yaitu fasa diam dan fasa bergerak. Mekanisme terdistribusinya komponen-komponen yang ada pada kedua fasa itu dapat disebabkan oleh peristiwa absorpsi, partisi, reaksi penukar ion dan difusi dari komponen ke dalam pori-pori fasa diam sehingga terjadi pemisahan (Harborne, 1987; Padmawinata, 1997).

Pemisahan kromatografi berdasarkan pada sifat-sifat dari molekul. Sifat utama yang terlibat adalah kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (absorpsi) dan kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian). Pada sistem kromatografi, cairan yang dipisahkan ditempatkan dalam keadaan tertentu sehingga komponen-komponennya harus menunjukkan dua dari ketiga sifat tersebut (Stahl, 1969).

Ada beberapa teknik kromatografi yang dikembangkan antara lain: kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom dan kromatografi radial. Pemilihan teknik kromatografi tergantung kepada sifat, jumlah dan kelarutan dari senyawa yang akan dipisahkan.

2.4.2 Kromatografi Lapis tipis

Kromatografi Lapis Tipis adalah suatu metode pemisahan berdasarkan sifat fisika dan kimia. Lapisan KLT terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan pada plat berupa bercak atau pita. Kemudian plat diletakkan ke dalam bejana tertutup rapat berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak).

Untuk campuran yang tidak diketahui, fasa diam dan fasa gerak harus dipilih dengan tepat karena keduanya bekerja sama dalam pemisahan. Hal penting lain yang harus diperhatikan adalah memilih kondisi kerja yang optimum yang meliputi sifat pengembangan dan atmosfer bejana (penjenuhan) (Stahl, 1985; Suganda, 1997).

Penggunaan KLT secara umum adalah untuk tujuan:

1. Kualitatif

Yaitu berdasarkan harga R_f yang didefinisikan sebagai pembanding jarak rambat yang dicapai oleh senyawa dengan fasa gerak. Harga R_f tidak selalu pasti sama, oleh karena itu harga R_f digunakan sebagai :

- a. Petunjuk jarak migrasi relatif
- b. Orientasi pemilihan fasa gerak untuk kromatografi kolom
- c. Monitoring hasil pemisahan kromatografi kolom

2. Kuantitatif

yaitu penetapan visual dari ukuran bercak dibanding senyawa pembanding atau dengan metode spektrofotometer atau dilakukan dengan pengerokan, pengelusian dan metode spektroskopi. Pemakaian kuantitatif untuk menunjukkan banyaknya masing-masing komponen campuran relatif terhadap komponen lain atau mutlak jika digunakan baku pembanding atau kalibrasi yang sesuai.

3. Preparatif / Analitik

Yaitu untuk memperoleh komponen campuran dalam jumlah yang memadai dalam keadaan murni untuk kebutuhan lain.

Fasa diam pada KLT mempunyai beberapa penyerap yang digunakan, diantaranya yaitu :

a. Silika gel

Merupakan penyerap yang paling banyak dipakai dan bersifat agak sedikit asam, maka asam agak sedikit mudah dipisahkan dengan meminimalkan reaksi asam-basa antara penyerap dan senyawa yang dipisahkan.

b. Alumina

Bersifat sedikit basa dan sering digunakan untuk memisahkan basa dengan meminimumkan reaksi asam-basa.

c. Selulosa

Merupakan bahan penyangga lapisan zat cair yang dipakai dalam Kromatografi Cair-Cair (KCC), digunakan untuk memisahkan senyawa polar seperti asam amino, karbohidrat, nukleotida dan berbagai senyawa hidrofil lainnya.

Untuk pendeteksian senyawa yang dipisahkan dapat digunakan berbagai macam cara. Deteksi yang paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (254 nm) atau jika senyawa dapat dieksitasi ke fluoresensi radial UV gelombang panjang (365 nm). Jika senyawa tidak dapat menyerap sinar UV maka pendeteksian dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi kimia baik dengan pemanasan atau tanpa pemanasan (Suganda, 1997).

2.4.3 Kromatografi Kolom

Untuk memisahkan senyawa dalam jumlah besar dapat digunakan kromatografi kolom. Teknik kromatografi kolom ini pertama kali digunakan oleh Tswett seorang ahli botani dari Rusia. Dimana untuk memisahkan klorofil dengan pigmen lainnya dari tumbuhan dengan memakai tabung gelas sempit yang diisi dengan kalsium karbonat sebagai fasa diam dan dielusi dengan protelem eter sebagai fasa geraknya yang menghasilkan pita-pita berwarna yang disebut kromatogram (Determan, 1969).

Pemisahan secara kromatografi berdasarkan fasa diam dan fasa gerak. Komponen yang akan dipisahkan mempunyai afinitas yang berbeda terhadap adsorben sehingga komponen yang non polar tidak sama keluar dengan komponen polar.

Ukuran kolom sangat beragam, tetapi biasanya panjang kolom sekurang-kurangnya 10 kali garis tengah dalam dan mungkin saja sampai 100 kalinya. Nisbah panjang terhadap lebar sebagian besar ditentukan oleh mudah atau sukarnya pemisahan. Ukuran kolom dan banyaknya fasa diam yang dipakai ditentukan oleh bobot campuran yang akan dipisahkan.

Ukuran partikel fasa diam untuk kolom lebih besar dibandingkan dengan KLT. Ukurannya 63-350 μm untuk kolom yang dijalankan dengan gaya tarik bumi. Kolom yang dijalankan dengan tekanan biasanya mengandung partikel 40-63 μm atau lebih halus (Stahl, 1969).

Jenis penyerap yang biasa dipakai untuk kolom adalah :

1. Silika gel

Merupakan penyerap yang paling banyak dipakai dengan semua pelarut, tetapi menunjukkan kemampuan berikatan hidrogen ini dimana silika gel akan mengembang sehingga memperlambat aliran pelarut (Stahl, 1969).

2. Alumina

Alumina (Al_2O_3) adalah penyerap yang banyak dipakai dan terdapat dalam beberapa bentuk modifikasi. Hampir semua senyawa organik, kecuali hidrokarbon alifatik jenuh, dapat terserap oleh alumina basa. Tetapi alumina dapat diperlakukan memakai asam klorida untuk diubah menjadi bentuk asam atau memakai asam nitrat untuk diubah menjadi bentuk netral (Stahl, 1969).

3. Sephadex

Sephadex adalah suatu gel dextran yang banyak digunakan untuk kromatografi kolom. Pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekul, dimana molekul besar terelusi lebih dahulu sedangkan molekul dengan ukuran yang lebih kecil akan terperangkap dalam pori-pori sephadex. Cara ini berguna untuk pemisahan glikosida. Kapasitas lebih besar karena ukuran partikel lebih teratur. Sebelum dikemas gel harus dikembangkan dulu dalam pengelusi selama 12 jam. Sephadex stabil dalam alkali dan asam lemah.

2.4. 4 Metode Pemurnian (Harborne, 1987)

Komponen-komponen senyawa yang didapat dari kromatografi kolom biasanya belum dalam bentuk murni, tetapi masih terkontaminasi oleh senyawa- senyawa pengotor lainnya. Salah satu teknik pemurnian adalah rekristalisasi, yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat yang akan dimurnikan dengan pengotor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut yang cocok.

Rekristalisasi merupakan suatu proses dimana suatu kristal padat dilarutkan dalam suatu pelarut kemudian dibuat kembali menjadi kristal padat dengan cara pengendapan. Hal yang penting dalam proses rekristalisasi ini adalah pemilihan pelarut yang digunakan untuk pemurnian. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuannya melarutkan zat yang akan dimurnikan dengan baik, dapat memisahkan pengotor, dapat menghasilkan kristal murni serta tidak bereaksi secara kimia dengan zat yang dimurnikan.

Proses rekristalisasi ini secara sederhana dapat dilakukan dengan cara melarutkan dengan pelarut yang sesuai dengan titik didihnya, penyaringan larutan panas jika terlihat ada partikel-partikel yang tidak larut, pendinginan larutan panas sehingga senyawa terlarut mengkristal dan pemisahan kristal dari larutan induknya. Jika proses kristalisasi digunakan pelarut campur, maka setelah penyaringan larutan panas, ditambah pelarut yang daya melarutkan zatnya kecil sampai terbentuk kabut pengendapan. Proses rekristalisasi ini diulangi beberapa kali sehingga didapat kristal yang murni yang ditandai dengan titik leleh tajam atau jarak lebur yang sempit.

2.5. Metoda Pengujian

Uji aktivitas sitotoksik dapat dilakukan dalam beberapa tahapan meliputi pra-skrinning terhadap bermacam-macam sampel, skrinning, monitoring, dan pengujian lanjut. Pra-skrinning dilakukan untuk melihat apakah sampel-sampel yang diuji memiliki aktivitas yang diinginkan atau tidak. Pada tahap ini pengujian tidak perlu bersifat kuantitatif. Pengujian dilakukan pada tahap skrinning atau pada tahap pemilihan sampel. Pada tahap ini pengujian hanya dilakukan terhadap sampel-sampel yang telah melewati tahap pra-skrinning, dan memenuhi syarat untuk digunakan dalam pengujian lanjutan.

Tahap monitoring dilakukan untuk mengarahkan proses pemisahan dan pemurnian sampel, hingga akhirnya didapatkan senyawa bioaktif murni. Sedangkan pada tahap pengujian lanjutan dilakukan untuk pengembangan kearah uji klinis yang lebih spesifik. Pengujian pada tahap ini lebih terperinci sehingga disebut juga evaluasi terperinci (Thomson, 1985).

2.5.1. Uji Hayati

Multi disiplin ilmu: kimia, biokimia, mikrobiologi, farmakologi, enzimologi, mikologi, dan lain sebagainya sangat dibutuhkan dalam uji hayati (Ghisalberti, 1993). Tumbuhan sangat berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber senyawa kimia baru, khususnya yang bersifat aktif biologis (Kardinan dan Taryono, 2003). Senyawa-senyawa ini digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya penyakit kanker (Kardinan dan Taryono, 2003; McLaughlin, 1991).

Suatu metoda yang berguna untuk mendeteksi aktifitas biologis adalah bioassay primer. Ekstrak tumbuh-tumbuhan di uji aktifitas toksisitasnya dengan berbagai konsentrasi secara *in vitro*, ekstrak yang memperlihatkan aktifitas toksisitas yang kuat dilanjutkan pengujian terhadap komponennya. Apabila masih menunjukkan aktifitas yang nyata maka dilanjutkan pengujian secara *in vivo* pada hewan percobaan yang ditransplantasikan dengan sel tumor manusia (Ghisalberti, 1993; Cordell, Kinghorn, and Pezzuto, 1993).

Beberapa kriteria yang harus dipenuhi untuk uji hayati yaitu: cepat, tepat, dapat dipercaya, murah, sensitif, membutuhkan sedikit sampel dan bisa mengidentifikasi aktifitas secara luas serta dapat dilakukan sendiri oleh peneliti yang memiliki

pengalaman yang terbatas dalam melakukan bioassay secara mendalam (Ghisalberti, 1993).

Banyak faktor yang mempengaruhi untuk mendapatkan senyawa aktif biologis melalui pendekatan aktifitasnya, diantaranya adalah kecilnya kelarutan dari suatu ekstrak atau fraksi dalam pelarut yang digunakan. Untuk mengatasi hal ini, ekstrak tersebut biasanya disuspensikan dalam polivinilpirolidon atau menggunakan pelarut yang cocok seperti dimetilsulfoksida (DMSO). Faktor lain yang mempengaruhi adalah kombinasi efek seperti efek sinergis, perubahan kimia selama ekstraksi, manipulasi ekstrak dan hilangnya aktifitas suatu senyawa yang disebabkan oleh adanya senyawa lain yang mempunyai efek berlawanan (Harborne, 1973).

2.5.5. Metoda Brine Shrimp Lethality Bioassay

Uji hayati kematian udang laut merupakan salah satu metoda yang digunakan untuk mendeteksi berbagai zat toksik dan telah diaplikasikan pada ekstrak tanaman sejak 1982. Metoda ini merupakan skrinning awal terhadap ekstrak, fraksi ekstrak, ataupun senyawa murni yang berasal dari tumbuhan. Pada umumnya hasil dari uji mempunyai korelasi dengan sitotoksisitas dan aktifitas pestisida. Disamping itu uji ini dapat digunakan untuk skrinning awal terhadap senyawa-senyawa yang diduga bersifat antitumor (Anderson, Guetz, and McLaughlin, 1991).

2.5.6 Keunggulan metoda Brine Shrimp Lethality Bioassay

Pengujian dengan cara ini memiliki beberapa keunggulan antara lain ujinya sederhana yaitu menggunakan sejumlah kecil senyawa uji, murah, mudah pengerjaanya dan waktu yang digunakan relatif singkat serta dapat dipercaya (Meyer, Ferrigni,

Jacobsen, Nichols, and McLaughlin, 1982). Disamping itu metoda ini telah diuji dan memiliki korelasi yang positif dengan metoda yang telah biasa digunakan untuk penapisan senyawa anti kanker (Meyer, *et al.*, 1982).

Metoda ini menggunakan larva *Artemia Salina* Leach. sebagai hewan percobaan. Penggunaan *Artemia salina* L. sebagai hewan uji mempunyai beberapa keuntungan antara lain telurnya mudah didapat, murah, bisa tahan beberapa tahun bila disimpan ditempat yang kering, pertumbuhannya yang cepat menjadi larva, dan mempunyai range toleransi salinitas yang luas (antara 10-220 g/L) serta larva *Artemia* dapat hidup selama 3 hari (72 jam) dari sumber yolk mereka sehingga tidak perlu diberi makan (Carballo, Inda, Perez, and Gravalos, 2002). Uji hayati kematian udang laut *Artemia salina* Leach., selain dapat digunakan sebagai petunjuk aktifitas senyawa sitotoksik juga dapat digunakan sebagai petunjuk aktifitas anti parasit, insektisida, mikotoksik, anaestetik, analisis pencemaran air oleh logam-logam pestisida (Harwig and Scott, 1971).

2.6 Tinjauan Biologi *Artemia salina* Leach.

2.6.1 Klasifikasi

Artemia merupakan zooplankton yang diklasifikasikan sebagai berikut (Harefa, 1997; Mujiman, 1987; Departemen Pertanian, 1992):

Kingdom : Animalia

Filum : Arthropoda

Kelas : Crustasea

Famili : Artemiidae

Spesies : *Artemia salina* Leach.

2.6.2 Morfologi Genus *Artemia*

Telur *Artemia* yang kering berbentuk bulat cekung, berwarna coklat. Telur ini umumnya mempunyai diameter 200-300 mikrometer dan didalamnya terdapat embrio yang tidak aktif.

Nauplius *Artemia* mempunyai tiga pasang anggota badan yaitu antennula, antenna 1 yang berfungsi sebagai alat sensor, antenna II berfungsi sebagai alat gerak atau penyaring pakan dan rahang bawah belum sempurna. Dibagian kepala, antara kedua antenna terdapat bintik merah (ocellus) yang berfungsi sebagai mata nauplius.

Artemia dewasa berukuran 1-2 cm dengan sepasang mata majemuk dan 11 pasang kaki atau secara khusus disebut thoracopoda. Setiap thoracopoda mempunyai eksopodit, endopodit dan epipodit yang masing-masing berfungsi sebagai alat pengumpul pakan, alat berenang, dan alat pernafasan. Pada *Artemia* jantan, antenna II berkembang menjadi alat penjepit dan pada bagian belakang perut terdapat sepasang penis. Sedangkan pada *Artemia* betina antenna menjadi alat sensor dan pada kedua sisi saluran terdapat sepasang ovary. Telur-telur yang telah masak dipindahkan dari ovary kedalam saluran kantong telur atau uterus (Pechmanee, 2009).

Pada perairan bersalinitasi tinggi, telur-telur *Artemia* tidak menetas menjadi embrio, tetapi pada lapisan luarnya terbentuk cangkang atau korion. Telur yang terbungkus korion ini disebut dengan kista. Secara anatomi susunan kista *Artemia* terdiri atas dua lapisan, yaitu korion dan selaput embrio. Korion ini merupakan lapisan luar

pelindung inti telur (embrio) pada kista. Lapisan berikutnya disebut lapisan kortikol. Disebelah dalam lapisan kortikol terdapat cadangan makanan yang digunakan nauplius sebelum mampu mencari makanan sendiri. Lapisan ini disebut lapisan alveola. Selanjutnya adalah lapisan cadangan makanan. Selaput embrio merupakan komponen penyusun bagian telur yang paling utama karena di dalam lapisan ini terdapat telur yang akan menjadi individu (Harefa, 1997).



Gambar 3: *Artemia salina* Leach (www.DatabaseArtikel.com).

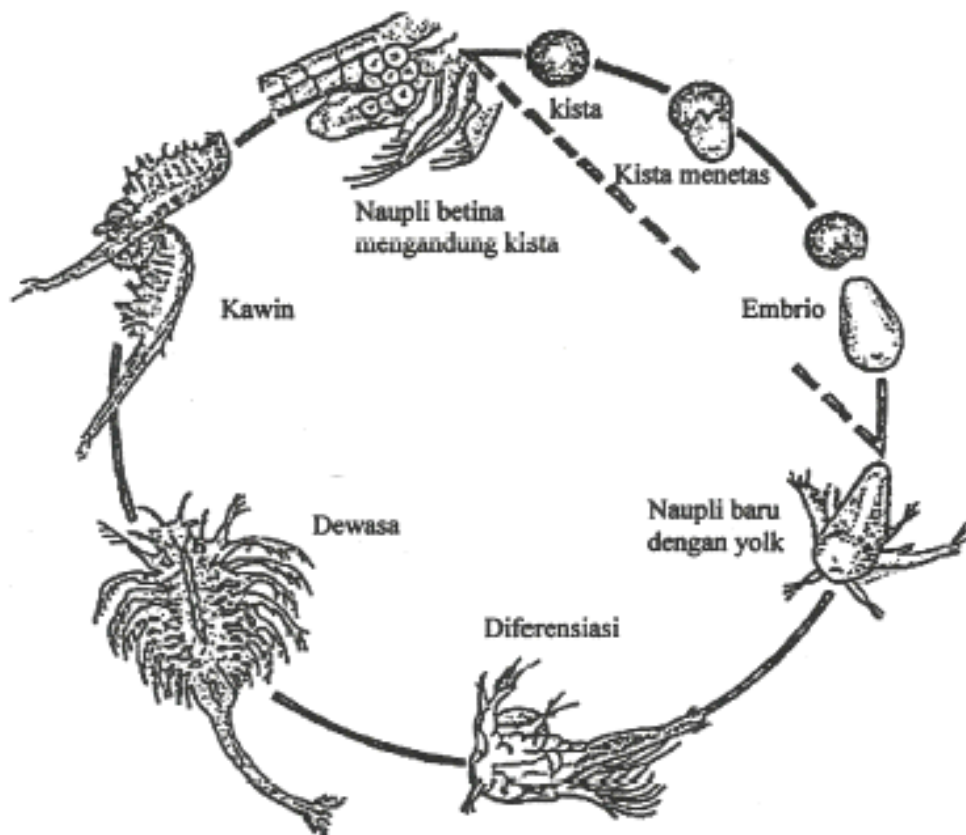
2.6.3 Siklus Hidup *Artemia*

Siklus hidup artemia diawali dengan penetasan telur artemia, telur menetas menjadi nauplius, kemudian tumbuh menjadi dewasa. Ada dua cara perkembangbiakan *Artemia*, yakni parthenogenesis dan biseksual. *Artemia* yang termasuk jenis parthogenesis populasinya hanya terdiri atas individu-individu betina saja. Proses perkembangbiakan tanpa melalui proses perkawinan, tetapi *Artemia* betina langsung saja bunting. Sedangkan pada *Artemia* jenis biseksual, populasinya terdiri dari jantan dan betina yang berkembang melalui perkawinan, embrio berkembang dari telur yang

dibuahi. Hasil perkembangbiakan dapat terjadi secara ovipar maupun ovovivipar, tergantung dari kondisi lingkungan (Harefa, 1997; Departemen Pertanian, 1992).

Pada perkembangbiakan secara ovovivipar, yang keluar dari induknya itu sudah berupa anak atau burayak yang disebut nauplius, dan terjadi bila kandungan oksigen cukup serta keadaan salinitas 80 ‰. Sedangkan pada cara ovipar, yang keluar dari induknya adalah berupa telur yang terangkang tebal, yang disebut kista. Untuk menjadi burayak harus melalui penetasan terlebih dahulu. Ini terjadi bila kandungan oksigen rendah dan keadaan salinitas diatas 80 ‰ atau kekurangan pakan (Harefa, 1997; Departemen Pertanian, 1992).

Individu yang baru ditetaskan ini dikenal dengan instar I, instar I ini akan berganti kulit menjadi instar II, demikian seterusnya sampai 15 kali. Setiap kali penggantian kulit dinamai nomor instar pada tahap tersebut sehingga penggantian kulit yang terakhir disebut XV. Selanjutnya *Artemia* berkembang menjadi individu dewasa dengan ukuran 10-20 mm. Perkembangan *Artemia* dari proses penetasan sampai menjadi individu dewasa membutuhkan waktu sekitar 7-10 hari. Pada saat dewasa *Artemia* siap melakukan proses perkawinan (Harefa, 1997; Departemen Pertanian, 1992).



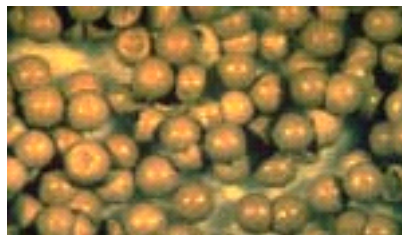
Gambar 4: Siklus Hidup *Artemia salina* Leach. (Pechmanee, 2009)

2.6.4 Penetasan telur *Artemia*

Siklus hidup *Artemia* diawali dari penetasan telur *Artemia*. Telur ini dapat bertahan sampai beberapa tahun bila disimpan ditempat kering dan bebas oksigen. Ketika telur diletakkan ke dalam air laut maka telur akan mengalami rehidrasi dan akan memulai perkembangannya (Departemen Pertanian, 1992; Lilly, 1995).

Langkah-langkah dasar dalam penetasan larva adalah telur diinkubasi selama 24-48 jam dalam air laut. Lalu larvanya akan terpisah dari telur-telur yang tidak menetas dari cangkangnya.

Selama proses penetasan, telur akan mengabsorpsi air dicangkangnya melalui proses osmosis. Ketika tekanan osmosis di bagian dalam telur cukup besar maka cangkang akan meletus dan membebaskan larva. Pada tingkat garam yang lebih tinggi, tekanan osmotik diluar telur akan lebih tinggi dari pada bagian dalam telur, sehingga akibatnya dapat memperpanjang waktu penetasan.



Gambar 5: Telur *Artemia salina* Leach (www.O-fish.com).

Untuk proses penetasan sebaiknya pH larutan berada pada kisaran 7,5-8,5 pH diatas 8,5 dan pH dibawah 6,5 dapat mengakibatkan penurunan hasil penetasan. Sedangkan pH dibawah 5 dan lebih dari 10 dapat membunuh biakan larva. Temperatur untuk proses penetasan berkisar antara 20-30°C, dengan suhu optimum pada 25°C.

Sistem airasi udara juga merupakan faktor penting dalam proses penetasan *Artemia*. Disini sistem airasi memiliki dua tujuan yaitu, untuk pemeliharaan tingkat oksigen yang terlarut serta untuk menjaga agar telur-telur tetap berada pada larutan penetasan (Departemen Pertanian, 1992; Lilly, 1995)

Pengaruh cahaya terhadap *Artemia* yang diketahui adalah yang berkaitan dengan tingkat keberhasilan penetasan. Penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa pada kondisi tanpa cahaya tingkat tetasan *Artemia* hanya mencapai sekitar 50% saja (Harefa, 1997).

2.6.5 Larva *Artemia*

Larva Brine Shrimp tumbuh dengan cepat dan ukurannya dapat menjadi dua kali lipat dalam 20 jam atau kurang. Larva ini mempunyai range toleransi salinitasi yang luas yaitu antara 10-220 g/L. Larva yang baru ditetaskan dapat bertahan hidup selama beberapa hari dari sumber yolk mereka sendiri sehingga tidak perlu diberi makan. Setelah 3 hari (72 jam) akan terjadi penurunan kadar sumber makanannya, sehingga apabila ingin dikembangkan lebih lanjut diberi tambahan makan dari luar. Larva *Artemia* ini bersifat positif Phototaxis dimana larva cenderung tertarik dan bergerak ke arah sumber cahaya (Harefa, 1997; Carballo, Inda, Perez, and Gravalos, 2002).

2.7 Metode Penentuan Lc50

Lethal concentration 50% = biasanya konsentrasi yang dapat membunuh 50% hewan percobaan.

Ada 3 macam metoda didasarkan pada persentase individu yang responsif pada kisaran tertentu, (Harborne, 1973):

1. Metoda Kurva
2. Metoda Farmakope Indonesia
3. Metoda Finney

2.7.1. Metoda Kurva

Metoda kurva menggunakan log kertas probit yang didesain khusus untuk perhitungan dosis respon. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Miller & Trainter (Harborne, 1973) garis vertical menyatakan nilai probit dan persentase respon. Sedangkan garis horizontal menyatakan dosis atau konsentrasi yang digunakan (Anderson, *et al.*, 1991). Dari kurva baku dapat diturunkan harga LC_{50} . tabel nilai probit dapat dilihat pada tabel I (Lembaga Penelitian Lembang, 1986).

2.7.2 Metode Farmakope Indonesia

Pada metode ini, LC_{50} dapat dihitung secara matematis dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$m = a - b (\sum p_i - 0.5)$$

Dimana :

$$m = \log LD_{50} \text{ atau } LC_{50}$$

a = log dosis atau konsentrasi terendah yang masih dapat menyebabkan kematian 100% pada hewan percobaan.

b = beda log dosis/ konsentrasi yang berurutan

$\sum p_i$ = jumlah hewan yang mati dibagi dengan jumlah hewan seluruhnya yang menerima dosis atau konsentrasi.

Persyaratan untuk menggunakan metode Farmakope Indonesia adalah :

1. Menggunakan seri dosis/ konsentrasi dengan pengenceran berkelipatan tetap.
2. Jumlah hewan dalam tiap kelompok harus sama.

3. Dosis/ konsentrasi diatur sedemikian rupa, sehingga memberikan efek dari 0% sampai 100% dan perhitungannya dibatasi pada kelompok percobaan yang memberikan efek 0% sampai 100%.

2.7.3. Metode Finney

Analisa probit dengan metoda ini diprogram khusus dengan menggunakan komputer. Dimana nilai probit diperoleh dengan memasukkan data dari dosis yang digunakan (minimal 3 dosis).

Pemanfaatan

Dikenal luas sebagai jenis tanaman pada tapak beriklim tropik. Sering dijumpai sebagai tanaman sela pada sistem agroforestry. Salah satu kayu serbaguna, digunakan untuk konstruksi ringan dan berat, bahan bangunan rumah, kayu pertukangan, ukiran dll.

Pohon yang berubah habitatnya: di tanah yang berbatu-batu, kurang airnya ia sangat bengkok, bercabang rendah, tinggi 15-20 m dan gemang 50 cm, sedangkan di tempat tumbuh yang baik tinggi puncaknya hampir dua kali lipat dan gemang dari batang yang berbentuk tugu itu 2 m lebih; dalam budidaya yang rapat batangnya tegak lurus bahkan tinggi puncaknya sampai 30 m. Di Jawa ia terdapat dari Krawang ke Timur (nampak) tumbuh menjadi liar di daerah-daerah dengan musim kemarau yang sangat panjang pada tanah yang agak kering berkala atau sangat kering, di Jawa Tengah sampai kurang

lebih 650 m, di Besuki tidak lebih dari 200 m di atas permukaan laut, pada umumnya tumbuh berkelompok, namun juga di sana-sini tersebar di sela-sela jenis pohon lainnya (K. And V. – VII, hlm, 165). Di luar Jawa dan Madura, dengan pulau-pulau yang berdekatan, dapat ditemukan hutan-hutan jati yang berarti di beberapa Kepulauan Sunda Kecil, seperti Bali dan Sumbawa (Zollinger: Verhandeling van het Bat. Gen. V. K. And W. DI.23, hlm. 104, dan terutama di Sulawesi Timur, di daerah ini selain lapangan-lapangan yang diserahkan pada suatu perseroan untuk dieksploitasi (kurang lebih 11.000 ha) terdapat suatu kompleks yang rapat dari 7000 ha lebih di pulau Muna dan sepanjang dikenal kira-kira 1.000 ha hutan baik dalam bagian selatan dari pulau Butung, yang letaknya sangat baik di teluk Sampolawa. Selanjutnya hutan jati pasti terdapat juga di Sulawesi Tenggara Rumbia dan Poleang (Handelsberichten 1920, hlm. 449).

Karena tumbuhnya yang berkelompok itu di daerah-daerah rendah dan sifat-sifatnya yang unggul itu maka jati adalah jenis kayu Indonesia yang terpenting.

Digunakan untuk jerami, hemostatik, depurative, anti-inflamasi, vulnerary, lepra, penyakit kulit, puritus, stomatities, malas borok, pendarahan, Hemoptisis, kondisi efektif disebabkan dari pitta.

Benih: diuretik, emollient, yg menawar rasa sakit, penyakit kulit, prurities dan dalam kondisi efektif disebabkan dari vata.Oil diperoleh dari biji mempromosikan pertumbuhan rambut dan berguna dalam eksim, kurap dan kudis untuk memeriksa.

Bark: Bronchitis, Sembelit, Anthelmentic, Depurative, hyperacidity, disentri, verminosis, sensasi terbakar, diabetes,

lepra, penyakit kulit, leucoderma, sakit kepala, tumpukan, pencahar, ekspektoran, anti-inflamasi, gangguan pencernaan, mengusir cacing dari tubuh dan dalam kondisi efektif disebabkan dari pitta.

Bunga: Bronchitis, biliousness, debit kemih, diuretik, depurative, anti-inflamasi sensasi, pembakaran, dipsia, kusta, kulit penyakit, diabetes strangury dan kondisi efektif disebabkan dari pitta dan Kapha.

Minyak yang diperoleh dari bunga mendorong pertumbuhan rambut dan berguna dalam kudis, eksim.

Infus bunga diambil dalam kemacetan hati.

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3. 1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama kurang lebih 7 bulan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Universitas Andalas, Padang.

3. 2 Metodologi Penelitian

3. 2. 1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pengerjaan isolasi adalah berupa seperangkat alat destilasi, seperangkat alat *rotary evaporator*, corong pisah, kolom kromatografi, bejana kromatografi lapis tipis, silika gel 60 (0,063-0,200 mm), gelas ukur, tabung reaksi,

pipet kapiler, pipet tetes, vial, kertas saring, corong, pinset, kapas, spatel, alumunium foil, timbangan, timbangan analitik, lampu UV.

3. 2. 3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan : daun *Tectona grandis* Linn. f., air suling, *n*-heksana, etil asetat, kloroform, silika gel 60 (0,063-0,200 mm), plat KLT, es batu.

3. 2. 3 Prosedur Penelitian

3. 2. 3. 1 Pengambilan sampel

Sampel berupa daun segar *Tectona grandis* Linn. f. diambil di kawasan Lubuk Minturun, Kota Padang, Sumatera Barat. Kemudian daun *Tectona grandis* Linn. f. segar dipisahkan dari pengotor dan dirajang.

3. 2. 3. 2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 6,9 Kg daun *Tectona grandis* Linn. f. segar dirajang dengan pisau sehingga menjadi potongan kecil. Sampel dimaserasi dengan pelarut metanol selama 5 hari sambil sesekali dikocok. Setelah 5 hari perendaman, diambil maseratnya dengan cara disaring dan perendaman dilanjutkan sampai 2 kali. Maserat yang didapat diuapkan pelarutnya secara *in vacuo* sehingga didapatkan ekstrak kentalnya. Sepertiga dari ekstrak kental tersebut ditambahkan air suling hingga volumenya 1 liter.

Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dengan menggunakan corong pisah. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar (*n*-heksana) tiap kalinya sebanyak 500 ml. Proses

dilakukan sampai fraksi *n*-heksana hampir tidak berwarna, sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi *n*-heksana digabung dan kemudian diuapkan secara *in vacuo* sehingga diperoleh fraksi kental *n*-heksana. Fraksinasi dilanjutkan dengan pelarut semi polar (etil asetat). Proses yang sama diulangi seperti pada pengerjaan fraksi *n*-heksana, sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi etil asetat diuapkan secara *in vacuo* sehingga diperoleh fraksi kental etil asetat.

3. 2. 3. 3 Isolasi dari daun *Tectona grandis* Linn. f.

Komponen yang terdapat dalam masing-masing fraksi dimonitor dengan KLT. Dari hasil penampakan noda di bawah lampu UV, fraksi etil asetat dengan eluen kloroform memperlihatkan pemisahan yang bagus dengan bercak noda yang memiliki berbagai warna berbeda. Kemudian dilakukan pemisahan dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fasa diam silika gel 60 yang dielusi secara isokratik oleh eluen kloroform.

Sebanyak 1,7 g fraksi etil asetat dipersiapkan secara preabsorpsi dengan menambahkan silika gel satu setengah dari berat sampel yang dimasukkan ke dalam sampel yang dilarutkan dengan etil asetat kemudian pelarutnya di uapkan secara *in vacuo* sehingga diperoleh campuran sampel dan silika gel dalam bentuk kering.

Kolom dipersiapkan dengan cara membuat suspensi silika gel dengan menggunakan pelarut kloroform, kemudian suspensi tersebut dimasukkan ke dalam kolom sambil diketok perlahan agar silika gel memadat. Dua per tiga sampel ditaburkan merata di atas suspensi silika gel dan dielusi dengan komposisi eluen sebagai berikut:

Kloroform 100%

1500 ml

Kloroform : metanol	95 : 5	200 ml
---------------------	--------	--------

Kloroform : metanol 1 : 1		200 ml
---------------------------	--	--------

Metanol	100%	100 ml
---------	------	--------

Fraksi yang keluar di tampung dengan vial volume \pm 10 ml. Hasil kromatografi kolom dimonitor dengan KLT, noda diamati dengan lampu UV. Noda yang memberikan Rf sama digabung dan diuapkan.

Hasil gabungan dimonitor pola KLT dan ditimbang. Hasil monitor didapatkan 13 subfraksi (MA-07-01-026* s/d MA-07-013-026). Sisa sampel yang telah dipreabsorpsi di kromatografi kolom dengan cara sama seperti di atas dan didapat 16 subfraksi (MA-07-01-035 s/d MA-07-016-035). Dari hasil pemisahan di atas, karena memiliki Rf noda target yang hampir sama, subfraksi ke 10 (MA-07-10-026) dari kromatografi kolom pertama dan subfraksi ke 12 (MA-07-012-035) dan subfraksi 13 (MA-07-013-035) dari kromatografi kolom kedua digabung sebanyak 64 mg dan kemudian dilanjutkan kembali kromatografi kolom dengan eluen sebagai berikut:

Kloroform	100%	750 ml
-----------	------	--------

Kloroform : metanol	95 : 5	100 ml
---------------------	--------	--------

Kloroform : metanol 1 : 1		100 ml
---------------------------	--	--------

Metanol	100%	50 ml
---------	------	-------

Fraksi yang keluar di tampung dengan vial volume \pm 5 ml. Hasil kromatografi kolom dimonitor dengan KLT, noda diamati dengan lampu UV. Noda yang memberikan Rf sama digabung dan diuapkan. Hasil gabungan dimonitor pola KLT dan ditimbang. Hasil monitor didapatkan 8 subfraksi.

*) Notasi MA-07-01-026 artinya: MA merupakan singkatan dari nama peneliti (Mardha Akhsanita); 07 adalah tahun angkatan peneliti; 01 adalah nomor urut subfraksi pada halaman tersebut; dan 026 adalah halaman buku kerja.

Subfraksi yang ketiga (MA-07-03-044) sebanyak 29 mg dimurnikan kembali dengan kromatografi kolom menggunakan eluen sebagai berikut:

Kloroform : etil asetat 9 : 1	500 ml
-------------------------------	--------

Metanol	100 %	100 ml
---------	-------	--------

Fraksi yang keluar di tampung dengan vial volume \pm 5 ml. Hasil kromatografi kolom dimonitor dengan KLT, noda diamati dengan lampu UV. Didapatkan 5 subfraksi.

Dari 13 subfraksi dari kolom pertama dipilih subfraksi-subfraksi yang memberikan warna puncak yaitu subfraksi ke 2 (MA-07-02-026), 3 (MA-07-03-026), 4 (MA-07-04-026), 5 (MA-07-05-026), 7 (MA-07-07-026), 8 (MA-07-08-026), 9 (MA-07-09-026), dan 12 (MA-07-012-026) (lampiran 5, 6, 7, dan 8) dilakukan uji aktivitas sitotoksik.

3. 2. 3. 4 Uji Aktifitas Sitotoksisitas dengan metoda Brine Shrimp

Pengujian aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Bioassay*, dengan cara sebagai berikut:

3. 2. 3. 4. 1 Pengambilan air laut

Air laut diambil dari Pantai Padang, sebelum dimasukkan ke dalam wadah penetasan air laut disaring terlebih dahulu.

3. 2. 3. 4. 2 Penetasan Telur *Artemia salina* Leach.

Larva uji yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dengan cara menetasakan *Artemia salina* Leach. di dalam wadah penetasan. Wadah penetasan terdiri dari dua bagian, yaitu bagian terang yang disinari lampu terus-menerus dan bagian gelap yang ditutup, serta dilengkapi dengan sistem airasi (gelembung udara). Sumber cahaya diletakkan untuk menarik larva, sedangkan sistem airasi berguna untuk pertumbuhan larva. Telur ditempatkan pada bagian gelap dari wadah yang sebelumnya telah diisi dengan air laut. Sebelum dimasukkan ke dalam penetasan, air laut disaring terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang mungkin terdapat pada air laut. Kemudian telur dibiarkan menetas selama 48 jam. Setelah menetas larva akan berenang melewati pembatas bercelah ke arah sisi bejana dengan pencahayaan. Larva yang berhasil melewati pembatas bejana penetasan dapat digunakan sebagai larva uji (lampiran 12).

3. 2. 3. 4. 3 Pengujian Sitotoksisitas

Pengujian aktifitas dilakukan dengan 5 variasi konsentrasi yaitu 500, 250, 125, 61 dan 31 ppm, dan setiap konsentrasi dibuat rangkap 3. Ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi sisa ditimbang sebanyak 40 mg. Sebanyak 40 mg sampel dilarutkan dalam 50 μ L DMSO ad 8 mL dengan air laut, homogenkan (larutan induk 5000 ppm). Larutan induk dipipet 3 x kali masing-masing 500 μ L, masukkan dalam vial yang berbeda. Kemudian pada masing-masing vial *ad.* 5 mL air laut (konsentrasi larutan 500 ppm). Larutan induk dipipet 3 x kali masing-masing 250 μ L, masukkan dalam vial yang berbeda. Kemudian pada masing-masing vial *ad.* 5 mL air laut (konsentrasi larutan 250 ppm). Larutan induk dipipet 3 x kali masing-masing 125 μ L, masukkan dalam vial yang berbeda. Kemudian pada masing-masing vial *ad.* 5 mL air laut (konsentrasi larutan 125 ppm). Larutan induk dipipet 3 x kali masing-masing 62 μ L, masukkan dalam vial yang berbeda. Kemudian pada masing-masing vial *ad.* 5 mL air laut (konsentrasi larutan 62 ppm). Larutan induk dipipet 3 x kali masing-masing 31 μ L, masukkan dalam vial yang berbeda. Kemudian pada masing-masing vial *ad.* 5 mL air laut (konsentrasi larutan 31 ppm). Sedangkan sebagai kontrol negatif disiapkan larutan uji yang hanya mengandung 50 μ L larutan DMSO, 10 larva udang dan air laut *ad.* 5 mL. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan dengan menghitung jumlah larva yang masih hidup pada setiap konsentrasi visual (Lampiran 13).

Kemudian uji aktifitas dilakukan dengan menurunkan konsentrasi, pengujian aktivitas dilakukan dengan 1 variasi konsentrasi yaitu 15 ppm, dan dibuat rangkap 3. Estrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi sisa ditimbang sebanyak 2 mg. Sebanyak 2 mg sampel dilarutkan dalam 50 μ L DMSO *ad.* 4 mL dengan air laut, homogenkan (larutan induk 500 ppm). Larutan induk dipipet 3 x kali masing-masing

150 μ L, masukkan dalam vial yang berbeda. Kemudian pada masing-masing vial *ad.* dengan 5 mL air laut (konsentrasi larutan 15 ppm) (Lampiran 14).

Masing subfraksi yang mempunyai warna-warna puncak juga dilakukan uji aktifitas sitotoksiknya (Lampiran 6).

3. 2. 3. 4. 4 Analisis Data

Analisis data menggunakan metoda kurva, menggunakan kertas log probit yang didesain bagi perhitungan dosis atau respon.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4. 1 Hasil

1. Dari 6.9 kg daun jati didapatkan ekstrak kental 312 gram (4,52%). Dari 104 gram (1,5%) ekstrak kental difraksinasi didapatkan fraksi kental *n*-heksana 37,487 gram (0,54%), fraksi kental etil asetat 12,45 gram (0,18%) dan fraksi sisa 54,063 gram (0,78%). Setelah dilakukan cek KLT dan dihitung R_f nya, fraksi yang akan dikolom adalah fraksi etil asetat (Lampiran 9).
2. Dari fraksi kental etil asetat sebanyak 1,7 gram, didapatkan 8 subfraksi dari kolom pertama yang mempunyai warna-warna puncak untuk dilakukan uji sitotoksitas.
3. Dari 8 subfraksi tersebut adalah MA-07-02-026 yang berwarna kuning terang, MA-07-03-026 yang berwarna oranye, MA-07-04-026 yang berwarna oranye tua, MA-07-05-

026 yang berwarna oranye-coklat, MA-07-07-026 yang berwarna merah-oranye, MA-07-08-026 yang berwarna merah, MA-07-09-026 yang berwarna coklat, dan MA-07-012-026 yang berwarna hijau (Lampiran 6).

4. Pada pengujian aktifitas "*Brine Shrimp Lethality Bioassay*" diperoleh nilai LC_{50} ekstrak daun jati adalah 6,309 ppm. Nilai LC_{50} fraksi etil asetat daun jati adalah 12,74 ppm. Nilai LC_{50} fraksi heksan daun jati adalah 14,38 ppm. Nilai LC_{50} fraksi sisa adalah 11,29 ppm (lampiran 16).